

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年5月13日 (13.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/039406 A1(51) 国際特許分類⁷: A61K 45/00, 35/76,
38/48, A61P 35/00, 43/00(KANEDA, Yasufumi) [JP/JP]; 〒562-0031 大阪府 箕面
市 小野原東 6-1 2-8 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013860

(74) 代理人: 古谷 聡, 外 (FURUYA, Satoshi et al.); 〒103-
0007 東京都 中央区 日本橋浜町 2-1 7-8 浜町花長
ビル 6 階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003年10月29日 (29.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-320577 2002年11月1日 (01.11.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ジェ
ノメディア株式会社 (GENOMIDEA INC.) [JP/JP]; 〒
530-0043 大阪府 大阪市 北区 天満四丁目 1 5 番 5 号
Osaka (JP). アンジェス エムジー株式会社 (ANGES
MG, INC.) [JP/JP]; 〒560-0082 大阪府 豊中市 新千里
東町一丁目四番二号 Osaka (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山本 誠司
(YAMAMOTO, Seiji) [JP/JP]; 〒565-0831 大阪府 吹
田市 五月が丘西 6 3-4 0 6 Osaka (JP). 小谷 均
(KOTANI, Hitoshi) [JP/JP]; 〒563-0037 大阪府 池田
市 八王寺 1-4-2 0-1 0 3 Osaka (JP). 金田 安史

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MEDICINAL PREPARATION HAVING CHEMOTHERAPEUTIC ENCAPSULATED THEREIN

(54) 発明の名称: 化学療法剤を封入した医薬製剤

(57) Abstract: It is intended to provide a medicinal preparation for transferring a chemotherapeutic (preferably an anticancer agent) into cells or the living body by using a virus envelope vector. Namely, a medicinal preparation containing a virus envelope vector having a chemotherapeutic encapsulated therein as the active ingredient. Examples of the anticancer agent include bleomycins, anthraquinone carcinostatic agents, mitomycins, actinomycins, taxane derivatives, camptothecins, cisplatin, staurosporines, vincristine, streptozotocin, 5-fluorouracil (5-FU) and its derivatives, pirarubicin, dolastatin and pharmacologically acceptable salts thereof. Examples of the virus include sendai virus, retro virus, adenovirus, adeno-associated virus, herpes virus, vaccinia virus, pox virus, influenza virus and so on.

(57) 要約: 本発明は、ウイルスエンベロープベクターを用いて細胞内あるいは生体内へ、化学療法剤、好ましくは抗癌剤を移入するための医薬製剤を提供する。化学療法剤を封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有する医薬製剤。抗癌剤として例えばブレオマイシン類、アントラキノン系制癌剤、マイトマイシン類、アクチノマイシン類、タキサン誘導体、カンプトテシン類、シスプラチン類、スタウロsporin類、ビンクリスチン、ストレプトゾトシン、5-フルオロウラシル(5-FU)およびその誘導体、ピラルビシン、ドラスタチン(Dolastatin)およびそれらの薬理学的に許容される塩を挙げることができる。ウイルスとして例えばセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、インフルエンザウイルス等を挙げることができる。

WO 2004/039406 A1

明細書

化学療法剤を封入した医薬製剤

発明の属する技術分野：

本発明は、遺伝子導入ベクターを用いて細胞内あるいは生体内へ、化学療法剤を移入する際に用いる医薬製剤に関する。

従来技術

現在のがん治療における治癒率は約 50%程度といわれ、その治癒は一般的には外科療法や放射線療法など局所療法によりもたらされる場合が多い。特に固形癌の治療においては、全身療法である化学療法が単独で治癒に貢献する割合は極めて少なく、各種療法と併用されるのが通常である。

一方外科療法では、全ての臓器癌の手術が可能となり、治療法として既に完成域に達していると考えられ、これ以上の治癒率向上は望めない。また放射線療法も感受性のある臓器癌の治療成績がほぼ一定率に達しており、同様にこれ以上の治癒率向上は望めない。

従ってこれらの治療法により、今後の癌治癒率の大幅な向上は期待しがたいため、癌の治癒率を現状の 50%からさらに改善し癌制圧に達するには、より優れた化学療法の開発が欠かせない。

化学療法に使用される抗癌剤は、癌細胞のような増殖能の高い細胞の殺細胞効果を目的としており、正常細胞、特に細胞増殖能の高い骨髄細胞等に与えるダメージが大きく、その結果患者に与える苦痛も大である。これは抗癌剤の送達法が注射剤による全身への投与であり、がん細胞以外の正常細胞にも抗癌剤が到達し、正常細胞が殺傷されホメオスタシスが機能しなくなるためである。

しかし現状では、抗癌剤を単独投与した際の効果は概ね 30%程度であるとされ

ており、ゲノムの遺伝子情報解析研究が進められ適切な抗癌剤の選定が今後可能なることも期待されているが、現時点での抗癌剤療法は効果と比較して副作用が高いといわれている。

これは抗癌剤全身投与により正常細胞がダメージを受けたためである。よって、癌組織特異的な抗癌剤の導入、加えて癌細胞への取り込み方法が確立できれば、理想的な抗癌剤の送達システムとなる。さらに、抗癌剤のベシクル (vesicle) への封入が可能になれば、標的臓器・細胞選択的に、しかも正常細胞への影響 (副作用) が少ない治療法を確立できる。また、これにより副作用が強く開発を断念した抗癌剤の再評価に結びつくものと考えられる。

発明の開示

本発明者らは上記問題を解決すべく鋭意検討した結果、化学療法剤を封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有する医薬製剤を完成させることができた。

従って本発明は具体的には例えば、外来遺伝子の封入能を有する不活性化 HIV-E ベクター等の中に、抗癌剤等を封入した医薬製剤を提供するものである。

本発明は、遺伝子導入ベクターを用いて細胞内あるいは生体内へ、化学療法剤、好ましくは制癌剤、抗癌剤または抗腫瘍剤 (以下まとめて、抗癌剤という) を移入する際に用いる医薬製剤に関する。より詳しくは、本発明は毒性の高い抗癌剤を遺伝子導入ベクターを用いて生体移入し、副作用を軽減して安全に、標的臓器あるいは細胞に到達させる医薬製剤に関する。

発明の実施の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において使用される化学療法剤とは、細胞に直接作用する低分子化合物

であれば限定されないが、例えば東京化学同人刊・生化学事典第3版には、「現在、選択毒性の高い化学物質を用いる治療法すなわち化学療法の対象は微生物による感染症のみならず悪性腫瘍にまで広げられている。」と記載されており、抗菌剤、抗癌剤等が含まれることは論を待たない。

なお本発明においては、化学療法剤としてより好ましくは制癌剤、抗癌剤または抗腫瘍剤(以下、抗癌剤と総称)を挙げることができ、抗癌剤としてさらに具体的には例えば、ブレオマイシン類、アドリアマイシン・ダウノマイシンのアントラキノン系制癌剤、マイトマイシン類、アクチノマイシン類、タキソール等のタキサン誘導体、イリノテカン等のカンプトテシン類、シスプラチン類、スタウロスポリン類、ピンクリスチン、ストレプトゾトシン、5-フルオロウラシル(5-FU)およびその誘導体、ピラルピシン、ドラスタチン(Dolastatin)およびそれらの薬理的に許容される塩を挙げることができる。

これら化学療法剤の中でも、さらに好ましくはブレオマイシン類を挙げることができ、具体的にはブレオマイシン(Bleomycin)またはその薬理的に許容される塩、あるいはペプロマイシン(Peplomycin)またはその薬理的に許容される塩を挙げることができ、さらに詳しくは塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシンを挙げることができる。

本発明にかかる医薬製剤を抗癌剤として使用する場合、適応となる癌の種類は限定されず、具体的には固形癌、血液細胞癌等を挙げることができる。これらの中でも固形癌が好適対象である。

固形癌としてより具体的には、例えば肺癌、乳癌、消化器癌、頭頸部癌、婦人科領域の癌、泌尿器科領域の癌、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫、原発不明癌等を挙げることができ、さらに具体的には、例えば消化器癌として胃癌、大腸癌、食道癌等を、頭頸部癌として上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌、口腔癌等を、婦人科領域の癌として子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌等を、泌尿器科領域の癌として

前立腺癌等を挙げることができる。

これらの固形癌の中でも、より好適な対象としては、皮膚癌、皮膚悪性腫瘍、頭頸部癌(上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、口腔癌など)、肺癌(特に原発性および転移性扁平上皮癌)、食道癌、悪性リンパ腫(細網肉腫、リンパ肉腫、ホジキン病など)、子宮頸癌、神経膠腫、甲状腺癌、前立腺癌を挙げることができる。

次に本発明におけるウイルスエンベロープベクターとは、ウイルスから RNA または DNA を取り除いた膜であり、通常は遺伝子、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、プラスミド等を封入して細胞移入(transfection)に利用されるものである。

ウイルスの種類も限定されないが具体的には、例えばレトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルスを挙げることができる。

本発明にかかるウイルスとしてさらに具体的には、例えばセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、インフルエンザウイルス等を挙げることができる。

これらの中でも、好ましくはマウス肺炎ウイルスの一つであるセンダイウイルス(Hemagglutinating Virus of Japan、以下 HVJ)を挙げることができる。

なおセンダイウイルスとして具体的には、例えば VR-105, VR-907 等を P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA 在の American Type Culture Collection (ATCC), telephone 1-703-365-2700 から購入することができる。

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,152376,VR-105&ext=Sendai&max=20>

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,1375478,VR-907&text=Sendai&max=20>

ウイルスエンベロープベクターについてより詳しくは、例えば特開 2001-286282 号公報 (W001/57204 号公報)、特開 2002-065278 号公報、W0-A 03/014338 (PCT/JP02/07879) 等に記載されており、具体的には例えば特開 2001-286282 号公報の実施例 8 などに従って調製することができる。

なお化学療法剤をウイルスエンベロープベクターに封入する工程においては界面活性剤を使用することが好ましく、界面活性剤として具体的には、例えばトリトン (Triton) X100、デオキシコール酸またはその塩、コール酸またはその塩等を挙げることができる。デオキシコール酸の塩として好ましくはデオキシコール酸ナトリウム、コール酸の塩として好ましくはコール酸ナトリウムを挙げることができる。

本発明にかかる医薬製剤の剤型は限定されないが、具体的には例えば注射剤、軟膏等を挙げることができ、好ましくは注射剤である。

続いて不活性化センダイウイルス・エンベロープベクター (以下、HVJ-E ベクター) の場合を例にとって、より詳細に説明する。

HVJ-E ベクターに抗癌剤を封入する場合には、抗癌剤を緩衝液に溶解する。ここで使用する緩衝液は限定されず、具体的には例えば、TE 緩衝液 (10mM トリス、1mM EDTA (pH8.0))、PBS (リン酸緩衝液) 等を適宜選択し使用できるが、pH が 6-9 の緩衝液が好ましい。

本発明の特長として、副作用あるいは毒性の強い抗癌剤を HVJ-E ベクターに封入し、in vitro 実験では培養液中に抗癌剤がもれることなく直接細胞に抗癌剤を送達することができる。

また in vivo 動物実験においては、抗癌剤の全身投与ではなく、局所投与を行うことが可能であり、固形癌の癌細胞のみに効率よく抗癌剤を送達することがで

きる。

さらに人の治療においては、抗癌剤封入 HVJ-E ベクターの単独投与による化学療法だけではなく、進行癌患者で抗癌剤の投与不能な患者に対し局所投与を行うことにより癌の退縮を図り、さらに放射線治療、外科的処理との併用により、一層優れた抗癌効果が得られる。

抗癌剤を封入した HVJ-E ベクターは、in vitro 実験ではホスト細胞にトランスフェクションする。その場合の手続きは、例えば抗癌剤を封入した HVJ-E ベクターの溶液を培養細胞の培地に添加するなどの方法を採用することができる。

トランスフェクションは 37℃ で反応させる場合、30 分以上、48 時間程度とする。効果判定は生細胞数のカウントあるいは WST assay (生細胞のカウント手法: cell counting kit-8, 同仁化学) により行うのが好ましい。

in vivo 動物実験における対象は、例えばマウスの場合、癌細胞が同系移植では免疫不全マウスではない通常マウスを、異種移植の場合はヌードマウスあるいは SCID マウスを使用するのが好ましい。

ペトリディッシュで培養した培養癌細胞をマウスの皮内に移植し、移植細胞が増殖後、抗癌剤を封入した HVJ-E ベクターを増殖固形癌部内に投与し、癌部の長径および短径を測定し、その抗癌効果測定をするなどの方法を採用することができる。

本発明により副作用が大きな抗癌剤を、簡便しかも安全に癌部に送達できる方法が提供される。

よって、わが国で急速に増加しつつある肺癌、乳癌、胃癌・大腸癌・食道癌などの消化器癌、頭頸部癌（上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌、口腔癌など）、婦人科領域の癌（子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌など）、泌尿器科領域の癌（前立腺癌）、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫、原発不明癌等すべての固形癌への新たな化学療法が、HVJ-E ベクターを用いることにより可能になる。

図面の簡単な説明

図 1 は、in vitro 実験における、各群の生細胞数を比較したグラフである (平均±標準偏差で示す)。

図 2 は、in vivo 実験における、各群の平均腫瘍容量を比較したグラフである (平均±標準偏差で示す)。

図 3 は、in vivo 実験における、投与 16 日後の各群の平均腫瘍容量の変化率、およびメデューム (PBS) 群に対する変化率を示したグラフである (平均±標準偏差で示す)。

図 4 は、実施例 3 の腫瘍体積結果を示すグラフである。

実施例

以下に、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

実施例 1 in vitro 実験

特開 2001-286282 号公報の実施例 8 に従い、6,000HAU/600 μ l (6 ウエルプレート 6 枚分) の不活性化した HVJ-E ベクターを-80℃から 34.5℃に移した。試料の入ったマイクロチューブを 15,000rpm、15 分間、4℃で遠心し、HVJ-E ベクターを沈殿物として回収し上清を除去した。得られた沈殿物を 60 μ l のプレオマイシン/PBS (5mg/ml) (塩酸プレオマイシン：日本化薬) 溶液に懸濁した。さらに 3%の Triton-X100 を 2 μ l 加え、Triton-X100 の最終濃度 0.1%の試料を調製し、氷中に 15 分間放置した。その後、PBS 溶液を 500 μ l 加えた。マイクロチューブを 15,000rpm、15 分間、4℃で遠心し、沈殿物を取らないよう上清を除去し、PBS 溶液を 500 μ l 加えた。再度、マイクロチューブを 15,000rpm、15 分間、4℃で遠心し、沈殿物を

取らないように上清を除去した。

得られた沈殿物を 180 μ l の PBS に懸濁し、試料溶液を 30 μ l ずつ 6 本のマイクロチューブに分注した。各チューブに 5mg/ml に調製したプロタミン硫酸溶液を 5 μ l、さらに 500 μ l の DMEM 溶液 (Dulbecco 変法 Eagle 培地) を加えた。

投与群として以下のものを調製し、それぞれ比較することによりその効果を評価した。

HVJ-プレオマイシン群; : 1, 000HAU, プレオマイシン 200ng/DMEM 500 μ l/1 well

HVJ-PBS; 群 : 1, 000HAU /DMEM 500 μ l/1 well

1/50 プレオマイシン群 : プレオマイシン 50 μ g/DMEM 500 μ l/ 1 well

1/500 プレオマイシン群 : プレオマイシン 5 μ g/DMEM 500 μ l/ 1 well

1/5, 000 プレオマイシン群 : プレオマイシン 500ng/DMEM 500 μ l/ 1 well

メデューム群 : DMEM

6 ウエルプレートに調製したマウス経腸癌細胞 CT26 に上記試料溶液を加えた。30 分間 37℃ の保温器中に放置後、培地 (DMEM, 10%FCS 含有) 500 μ l の交換を行った。37℃ の CO₂ 保温器中で 2 日間保温した。2 日後に生細胞数を数え、抗癌効果の評価を行った。

その結果を下表および図 1 に示す。

表 1

投与群	例数	平均	標準偏差
1/50 プレオマイシン群	2	81, 800	16, 688
1/500 プレオマイシン群	2	164, 600	13, 859
1/5, 000 プレオマイシン群	2	196, 800	15, 274
HVJ-プレオマイシン群	2	16, 800	170
HVJ-PBS 群	2	201, 100	8, 627
メデューム群	2	220, 100	23, 617

メデューム群、HVJ-PBS 各群における平均生細胞数は、220, 100 個、201, 100 個であった。培地へのプレオマイシン添加各群 (500ng, 5 μ g, 50 μ g) の生細胞数は、196, 800 個、164, 600 個、81, 800 個に対して、プレオマイシン HVJ-E 封入群の生細胞数は、16, 800 個となった。メデュームを 100%とし百分率で比較すると、HVJ-PBS 群 91. 4%、プレオマイシン 500ng, 5 μ g, 50 μ g 添加群 89. 4%、74. 8%、33. 9%であるのに対し、プレオマイシン HVJ-E 封入群における生細胞率はわずか 7. 6%であった。

この結果、プレオマイシンを HVJ-E に封入することにより劇的な細胞殺傷効果を得ることに成功した。プレオマイシンの培養液添加時の細胞殺傷効果があまり大きくないことを考えると、HVJ-E ベクターにより直接細胞に導入した場合の効果の大きさが分かる。

本結果は、全身投与により重篤な副作用を引き起こすような抗癌剤を HVJ-E ベクターに封入することによって、患者患部細胞に直接薬剤を運搬できる可能性を示した。

実施例 2 in vivo 実験

6, 000HAU/600 μ l の HVJ-E ベクターを -80℃ から 34. 5℃ に移し急速に可溶化した。試料の入ったマイクロチューブを 15, 000rpm, 15 分間、4℃ で遠心し、HVJ-E ベクターを沈殿物として回収し、上清を除去した。得られた沈殿物を 60 μ l のプレオマイシン/PBS (40mg/ml) 溶液に懸濁した。さらに 3% の Triton-X100 を 2 μ l 加え Triton-X100 の最終濃度が 0. 1% となるように調製し、氷中に 15 分間放置した。

その後、PBS 溶液を 500 μ l 加えた。マイクロチューブを 15, 000rpm, 15 分間、4℃ で遠心し、沈殿物を取らないよう上清を除去し、PBS 溶液を 500 μ l 加えた。再度、マイクロチューブを 15, 000rpm, 15 分間、4℃ で遠心し、沈殿物を取らないよう上清を除去した。沈殿物を 120 μ l の PBS に懸濁した。

投与群として以下のものを調製し、それぞれ比較することによりその効果を評価した。

HVJ-プレオマイシン投与群：5,000HAU, プレオマイシン $6.5 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ /匹

HVJ-PBS 投与群：5,000HAU / $100 \mu\text{l}$ /匹

$65 \mu\text{g}/\text{ml}$ プレオマイシン投与群：プレオマイシン/PBS ($65 \mu\text{g}/\text{ml}$), $100 \mu\text{l}$ /匹

PBS 投与群： $100 \mu\text{l}$ の PBS

動物実験には、BALB/c マウス (週齢：8 週齢、雄) を用いた。経腸癌 CT26 の移植部位はマウス背部皮内とし、移植癌細胞容量測定のために背部を剃毛した。移植用 CT-26 細胞は、10%FCS 含有 DMEM 溶液にて調製し、 5×10^6 個 ($100 \mu\text{l}$ PBS/匹) の細胞を背部に移植した。麻酔は、20 倍希釈ネンブタール注射液 $500 \mu\text{l}$ の腹腔内投与にて行った。移植癌細胞容量は、長径 \times 短径 \times 短径 $/2$ の計算法にて見積もった。移植 1 週間後に腫瘍径が 7-8mm となったところで、上記調製試料 $100 \mu\text{l}$ を、それぞれマウス癌部に投与した。癌細胞移植後 7、10、13、16、19 日後 (つまり 3 日毎) に腫瘍系を測り、抗癌効果を評価した。動物数は各群 8 とした。

その結果を下表および図 2 に示す。(上段；平均、下段；標準偏差)

表 2

投与後日数	7	10	13	16
$65 \mu\text{g}/\text{ml}$	158.4	413.70	754.7	1234.6
プレオマイシン	25.4	71.20	206.6	332.8
HVJ-プレオマイシン	136.2	285.70	456.7	676.1
	16.2	77.60	116.4	209.2
HVJ-PBS	164.3	362.20	688.1	1083.1
	23.8	73.70	143.7	243.8
メデューム (PBS)	158.7	418.20	738.7	1277.7
	33.3	62.50	97.9	162.7

また投与 16 日後における各群の平均腫瘍容量、およびメデューム (PBS) 群に対

する変化率を図3に示す。

調製試料接種時に差が認められなかった腫瘍径に、試料投与3日目以降(図2では10dayに相当)差が認められた(図2)。9日後(図2では16dayに相当、試料投与9日後)の腫瘍容量は、前述の計算式より算出した結果、PBS投与群:1,277mm³、65μg/ml BLM投与群:1,235mm³、HVJ-PBS投与群:1,083mm³、HVJ-BLM投与群:676mm³となった(図2)。百分率比で表すと、PBS投与群:65μg/ml BLM投与群:HVJ-PBS投与群:HVJ-BLM投与群=0%:3.4%:15.2%:47.1%(図3)となった。プレオマイシンを直接腫瘍患部に投与した群では、PBS投与群に比べて3.4%の腫瘍縮小効果に留まり、ほとんど腫瘍容量の縮小効果が認められなかった。これは、通常行われている全身投与とは異なり腫瘍内部への直接投与によるものか、低濃度投与によるものか、あるいはその他の要因であるかは今回の結果からでは判断できない。HVJ-PBS投与群では腫瘍容量縮小効果が15.2%となり、HVJ-Eベクターのみでもある程度の効果が認められた。これはHVJ-Eにより惹起された免疫作用による抗癌効果がある程度現れたものと予想される。それに比べてプレオマシン封入投与群では腫瘍容積が47.1%となり、高い抗癌効果が認められた。

実施例より、以下のことが示された。

- ・ in vivoにおいては、固形腫瘍細胞にプレオマシンを直接投与してもほとんど抗癌効果は認められなかった。
- ・ HVJ-Eベクター単独でも、弱い抗癌効果が認められた。
- ・ HVJ-Eにプレオマイシンを封入し固形腫瘍中に直接投与した場合には、優れた抗癌効果が認められた。

実施例3 in vivo 実験(2)

(1) 試験デザイン

マウス大腸癌由来 CT-26 細胞を、8 週齢の BALB/cAnNCrj 系雄マウスの背部皮内に移植し、腫瘍径 (長径) が約 5mm となった動物 (各群 10 匹) に、0.2 あるいは 0.4mg/body のプラトシン注 (シスプラチン, CDDP) を腹腔内に単回投与し、投与の 1 日後に HVJ-E、あるいはプレオマイシン 13.2mg を含有する HVJ-E/BLM を腫瘍内に単回投与した。腫瘍内投与の 21 日後に屠殺して HVJ-E/BLM の抗腫瘍作用を調べた。

なお、本試験での群構成を以下に示す。

群	比較対照物質		被験物質	
	腹腔内投与 (mg/body) *		腫瘍内投与 (mg/腫瘍) **	
対照群	生理食塩液	0	生理食塩液	0
HVJ-E 群	生理食塩液	0	HVJ-E	0
13mg/tumor HVJ-E/BLM 群	生理食塩液	0	HVJ-E/BLM	13
0.2mg/body CDDP 群	CDDP	0.2	生理食塩液	0
0.4mg/body CDDP 群	CDDP	0.4	生理食塩液	0
0.2mg/body CDDP-13mg/tumor HVJ-E/BLM 群	CDDP	0.2	HVJ-E/BLM	13
0.4mg/body CDDP-HVJ-E 群	CDDP	0.4	HVJ-E	0

* : シスプラチン (CDDP) として

** : プレオマイシン (BLM) として

(2) 実験方法

2-1) 癌細胞の培養

マウス大腸癌由来 CT-26 細胞を、10%FBS 含有 DMEM 培地を用い、37℃、5%CO₂ 存在下で培養した。

75 平方センチメートルのフラスコを用いて細胞培養を行った。約 80%コンフルエントに達した後、継代培養を行った。DMEM (10%FBS 含有) 液を除去後、10mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で細胞を洗浄し、1mL の 0.25%トリプシンおよび 1mmol/L EDTA-2Na 含有 PBS を添加し、37℃で細胞を剥離した。9mL の DMEM 培地を添加後、細胞を集め、遠心分離 (1000 rpm, 5 分間) にて細胞を回収した。上清除去後、10% FBS 含有 DMEM 培地にて細胞を希釈し、培養した。

2-2) 癌細胞懸濁液の調製

約 80%コンフルエントに達した細胞の培養液を除去後、PBS を用いて、培養フラスコを洗浄した。0.25%トリプシンおよび 1mmol/L EDTA-2Na 含有 PBS を少量添加し、37℃で細胞を剥離し始めるまで放置した。DMEM 培地を用いて細胞を集め、遠心分離 (1000 rpm, 5 分間) した。上清を除去後、PBS に懸濁した。再度遠心分離 (1000 rpm, 5 分間) し、上清を除去後、PBS を用いて 5×10^7 個/mL に調製した。

2-3) マウスの馴化

16 日間の検疫馴化期間中、固型飼料および飲水を自由に与えた。

2-4) 癌細胞の接種

検疫馴化が終了した動物にバリカンを用いて剃毛を実施した。マウスの背部に、ディスポーザブル注射筒および注射針 (26G) を用いて、100 μ L/site (5×10^6 個/body) を 59 匹の動物に皮内投与した。投与した翌日に 57 匹の動物 (未投与動物) に同様に投与した。

2-5) 動物の群分け

腫瘍の径(長径、短径)を、移植後4, 5, 6および7日目に測定(群分け後は測定しなかった)した。腫瘍径(長径)が4.5~5.5mm(実測値4.64~5.48mm)になった動物を、平均腫瘍径(長径)がほぼ均一になるよう、層別無作為化によって群分けした。

2-6) 投与

ディスポーザブル注射筒および注射針を用いて、各群、対照物質を1回腹腔内投与(1000 μ L)し、その1日後に被験物質を腫瘍内投与(100 μ L)した。

2-7) 腫瘍径の測定

投与日を投与後0日とした。投与後3, 6, 9, 12, 15, 18および21日に、全例について腫瘍径を計測し、腫瘍体積(長径 \times 短径 \times 短径 \div 2)を算出した。

2-8) 腫瘍重量の測定

各群全例、投与後21日(絶食16~24時間後)に、ペントバルビタールナトリウム(東京化成工業株式会社)水溶液(6.48mg/mL, 5mL/kg)の腹腔内投与による麻酔下で放血安楽死させた後、腫瘍を摘出し、重量を測定した。

(3) 結果

3-1) 腫瘍体積

対照群、HVJ-E 群、13mg/tumor HVJ-E/BLM 群、0.2mg/body CDDP 群、0.4mg/body CDDP 群および 0.2mg/body CDDP-13mg/tumor HVJ-E/BLM 群では、投与後 21 日まで腫瘍体積は経時的に増加し、投与後 21 日の腫瘍体積平均値はそれぞれ 3216.14, 2716.00, 2283.84, 1720.14, 1367.62 および 1022.34mm³であった (0.4mg/body CDDP 群は 3 例, その他は各 10 例)。0.4mg/body CDDP-HVJ-E 群の生存 1 例では、投与後 6 日に腫瘍体積は 122.27mm³まで増加し、投与後 9 日に 118.82mm³、投与 12 から 21 日は 13.12~23.26mm³に減少した。(図 4 参照)

3-2) 腫瘍重量

投与後 21 日の腫瘍重量は、対照群 (2570.35mg) \geq HVJ-E 群 (2428.64mg) $>$ 13mg/tumor HVJ-E/BLM 群 (1680.65mg) \geq 0.2mg/body CDDP 群 (1619.79mg) $>$ 0.4mg/body CDDP 群 (1164.13mg) $>$ 0.2mg/body CDDP-13mg/tumor HVJ-E/BLM 群 (987.33mg) $>$ 0.4mg/body CDDP-HVJ-E 群 (90.4mg) の順であった。なお、0.2mg/body CDDP-13mg/tumor HVJ-E/BLM 群では、投与時に存在した腫瘍が 10 例中 2 例で消失した。

以上の結果から、13mg/tumor の HVJ-E/BLM は、マウスに移植した CT-26 細胞に対して抗腫瘍作用を示し、その作用は、さらに CDDP 腹腔内投与との併用により増強されることが示された。

請求の範囲

1. 化学療法剤を封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有することを特徴とする医薬製剤。
2. 化学療法剤が制癌剤、抗癌剤または抗腫瘍剤である、請求項1記載の医薬製剤。
3. 化学療法剤がブレオマイシン類、アントラキノン系制癌剤、マイトマイシン類、アクチノマイシン類、タキサン誘導体、カンプトテシン類、シスプラチン類、スタウロスポリン類、ビンクリスチン、ストレプトゾトシン、5-フルオロウラシル (5-FU) およびその誘導体、ビラルビシン、ドラスタチン (Dolastatin) およびそれらの薬理学的に許容される塩から選ばれた1種以上である、請求項1または2記載の医薬製剤。
4. ブレオマイシン類が、ブレオマイシンまたはその薬理学的に許容される塩、あるいはペプロマイシンまたはその薬理学的に許容される塩である、請求項1～3のいずれか1項記載の医薬製剤。
5. ブレオマイシン類が、塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシンまたは硫酸ペプロマイシンである、請求項1～4のいずれか1項記載の医薬製剤。
6. ウイルスが、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、パキウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルス由来である、請求項1～5のいずれか1項記載の医薬製剤。
7. ウイルスがセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルスまたはインフルエンザウイルスから選ばれた1種である、請求項1～6のいずれか1

項記載の医薬製剤。

8. 化学療法剤が塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシンまたは硫酸ペプロマイシンから選ばれた1種以上であり、ウイルスがセンダイウイルスである、請求項1～7のいずれか1項記載の医薬製剤。

9. 注射剤である請求項1～8のいずれか1項記載の医薬製剤。

10. 化学療法剤をウイルスエンベロープベクターに封入する工程において界面活性剤を使用することを特徴とする、請求項1～9のいずれか1項記載の医薬製剤。

11. 界面活性剤がトリトン (Triton) X100、デオキシコール酸またはその塩、コール酸またはその塩から選ばれた1種である、請求項10記載の医薬製剤。

12. 固形癌の治療剤である、請求項1～11のいずれか1項記載の医薬製剤。

13. 固形癌が、肺癌、乳癌、消化器癌、頭頸部癌、婦人科領域の癌、泌尿器科領域の癌、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫または原発不明癌から選ばれた1種である、請求項1～12のいずれか1項記載の医薬製剤。

14. 消化器癌が胃癌、大腸癌または食道癌から選ばれた1種である、請求項13記載の医薬製剤。

15. 頭頸部癌が上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌または口腔癌から選ばれた1種である、請求項13記載の医薬製剤。

16. 婦人科領域の癌が子宮癌、卵巣癌または子宮頸癌から選ばれた1種である、請求項13記載の医薬製剤。

17. 泌尿器科領域の癌が前立腺癌である、請求項13記載の医薬製剤。

18. 化学療法剤を封入したウイルスエンベロープベクターと、白金錯体および/または代謝拮抗剤を併用することを特徴とする、癌の治療方法。

19. 白金錯体が、シスプラチン (cisplatin)、カルボプラチン (carboplatin)、パラプラチン (Paraplatin) またはネダプラチン (nedaplatin) から選ばれた一種で

ある、請求項 18 記載の、癌の治療方法。

20. 代謝拮抗剤が、6-メルカプトプリンリボシド (6-mercaptopurine riboside)、エノシタピン (enocitabin)、塩酸ゲムシタピン (gemcitabine HCl)、カルモフル (carmofur)、シタラピン (cytarabine)、シタラビンオクホスファート (cytarabine ocfosfate)、テガフル (tegafur)、テガフル・ウラシル (tegafur·uracil)、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム (tegafur·gimeracil·oteracil·pottasium)、ドキシフルリジン (doxifluridine)、ヒドロキシカルバミド (hydroxycarbamide)、フルオロウラシル (fluorouracil)、メトトレキセート (Methotrexate)、メルカプトプリン (mercaptopurine)、リン酸フルダラビン (fludarabine phosphate) から選ばれた一種である、請求項 18 記載の、癌の治療方法。

21. 化学療法剤を封入したウイルスエンベロープベクターと、シスプラチンおよび／またはフルオロウラシルを併用することを特徴とする、癌の治療方法。

22. 化学療法剤を封入したウイルスエンベロープベクターと、シスプラチンおよび／またはフルオロウラシルを併用し、さらに放射線照射することを特徴とする、癌の治療方法。

23. プレオマイシンまたはその薬理学的に許容される塩を封入したセンダイウイルスエンベロープベクターと、シスプラチンおよび／またはフルオロウラシルを併用し、さらに放射線照射することを特徴とする、固形癌の治療方法。

図 1

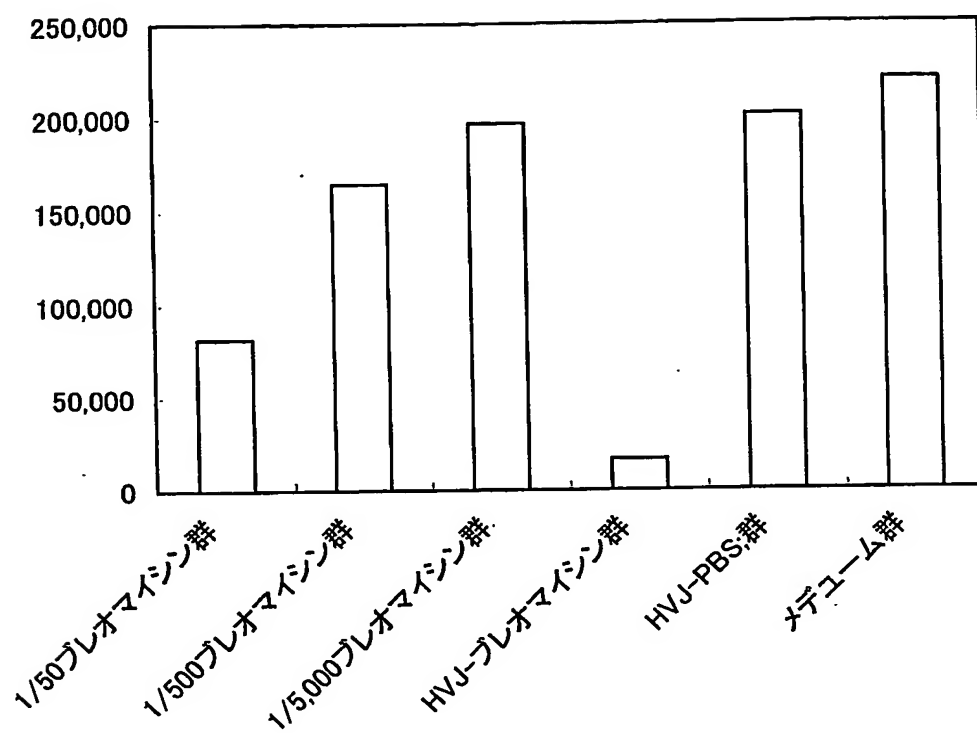


図 2

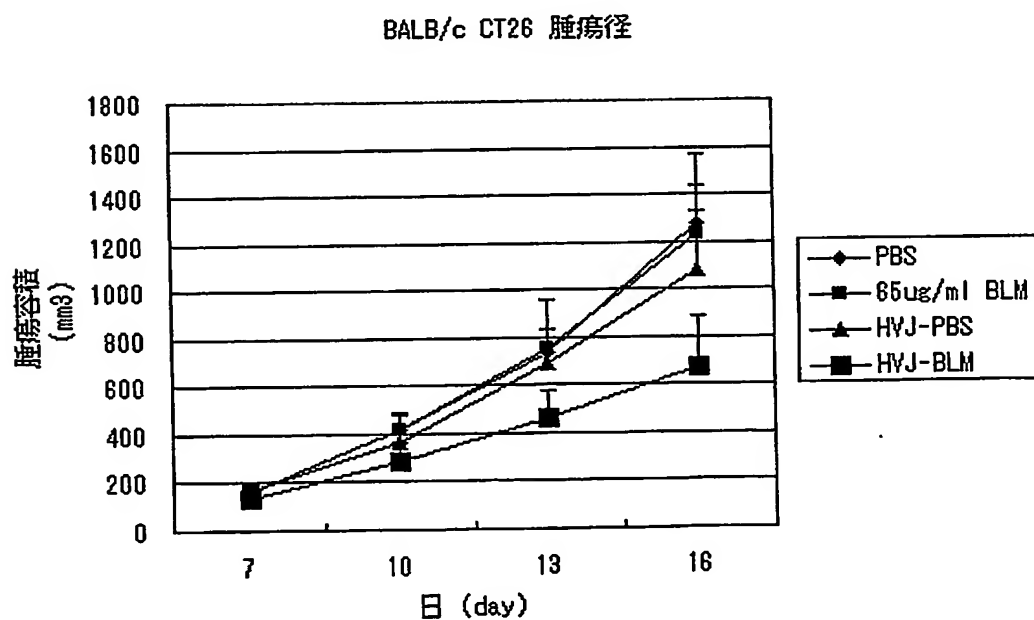


図 3

投与16日目における各群の平均腫瘍容量

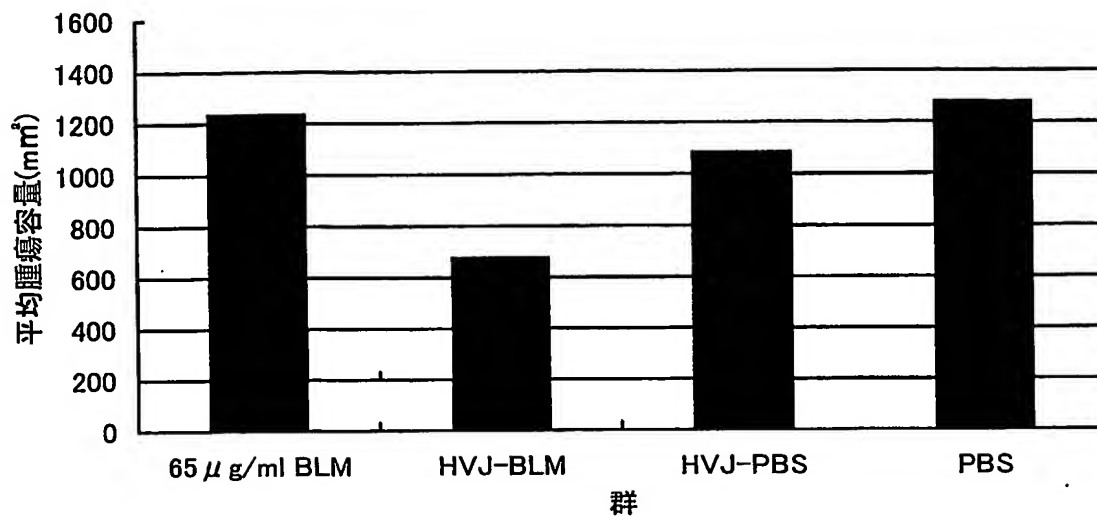
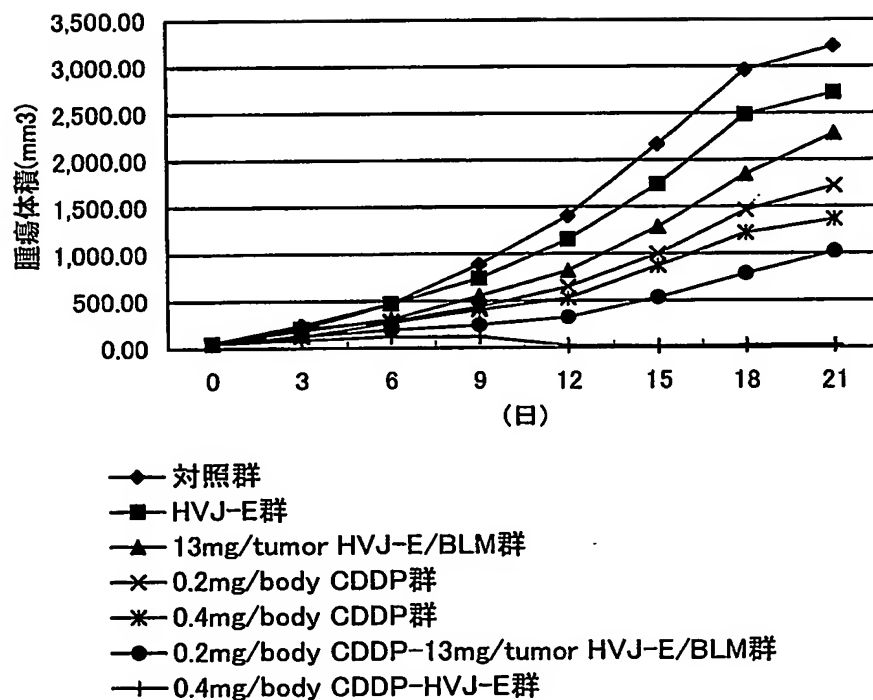


図 4

腫瘍体積の変化



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13860

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 35/76, 38/08, A61P35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 35/76, 31/00-38/58, 48/00, A61P35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, Y	WO 03/14338 A1 (Anges MG, Inc.), 20 February, 2003 (20.02.03), (Family: none)	1-17
Y	JP 2002-065278 A (Anges MG, Inc.), 05 March, 2002 (05.03.02), In particular, Claims; examples (Family: none)	1-17
Y	WO 01/57204 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 09 August, 2001 (09.08.01), In particular, Claims; examples & EP 1170363 A1 & JP 2001-286282 A	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 January, 2004 (28.01.04)

Date of mailing of the international search report
10 February, 2004 (10.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13860

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yasufumi KANEDA et al., "Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) Envelope Vector as a Versatile Gene Delivery System", Molecular Therapy, August 2002, Vol.6, No.2, pages 219 to 226	1-17
Y	WO 97/04748 A1 (Advanced Therapies, Inc.), 13 February, 1997 (13.02.97), In particular, Claims; page 25, line 21 to page 27, line 12; examples & AU 9666914 A1	1-17
Y	Yasufumi KANEDA, "Virosomes, evolution of the liposome as a targeted drug delivery system", Advanced Drug Delivery Reviews, 2000, Vol.43, pages 197 to 205	1-17
Y	Chikako TANAKA, Ryuichi KATO, "NEW Yakurigaku", 01 August, 1997 (01.08.97), pages 557 to 566	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13860

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 18 to 23

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 18 to 23 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.¹ A61K45/00, 35/76, 38/08, A61P35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.¹ A61K45/00, 35/76, 31/00-38/58, 48/00,
A61P35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
EY	WO 03/14338 A1 (アンジェス エムジー株式会社), 2003.02.20 (ファミリーなし)	1-17
Y	JP 2002-065278 A (アンジェス エムジー株式会社), 2002.03.05, 特に特許請求の範囲、及び実施例 (ファミリーなし)	1-17
Y	WO 01/57204 A1 (科学技術振興事業団), 2001.08.09, 特に特許請求の範囲、及び実施例 & EP 1170363 A1 & JP 2001-286282 A	1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.01.2004

国際調査報告の発送日

10.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ

4C

9454

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Yasufumi Kaneda et al., "Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) Envelope Vector as a Versatile Gene Delivery System", Molecular Therapy, August 2002, Vol.6, No.2, p.219-226	1-17
Y	WO 97/04748 A1 (Advanced Therapies, Inc.), 1997.02.13, 特に特許請求の範囲、第25頁第21行～第27頁第12行、及び実施例 & AU 9666914 A1	1-17
Y	Yasufumi Kaneda, "Virosomes, evolution of the liposome as a targeted drug delivery system", Advanced Drug Delivery Reviews, 2000, Vol.43, p.197-205	1-17
Y	田中千賀子, 加藤隆一, NEW薬理学, 1997.08.01, p. 557-566	1-17

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 18-23 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 18-23 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17 条 (2) (a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。